

用蜗牛酶提取和提纯隐球菌 DNA

赵 志 强

(海军四〇一医院皮肤科, 青岛 266071)

廖 万 清

(第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

摘要 本文介绍一种提取和提纯隐球菌 DNA 的方法。将蜗牛酶消化后所得的原生质体, 用 SE 液反复洗涤以除去夹膜多糖, 并用 55℃ 热处理裂解原生质体, 使 DNA 的提取和提纯得到了满意的结果。每克湿菌可获得 600μg 以上的 DNA, 而且所得的 DNA 样品特别适合于用 T_m 法测定 DNA G + C mol% 含量。

关键词 隐球菌 (*Cryptococcus*); DNA; 蜗牛酶; 提取

由于夹膜的存在, 使隐球菌壁的消化较一般酵母菌更加困难, 影响了对隐球菌进行 DNA 等方面的分子生物学研究。本文所介绍的方法, 操作简便, 不需精密仪器设备, 尤其适合基层单位开展隐球菌核酸方面的研究。

材 料 与 方 法

(一) 试验菌株

各试验菌株均为长征医院真菌病研究室保藏菌株。分别为新型隐球菌 D₄₄ (血清型: A), 新型隐球菌上海变种 S₅₀₁₂ (血清型: B), 新型隐球菌格特变种 (*variety gattii*) B₂₆₄₃ (血清型: C), 新型隐球菌 B₂₆₄₁ (血清型: D), 罗伦

隐球菌 (*C. laurentii*) RV₃₀₇₄, 格特变种 NIH₄₄₄ 由美国国立卫生研究所 (NIH) 提供。

(二) 主要试剂与仪器

1. 试剂: (1) 2-巯基乙醇 (Fluka)。 (2) 山梨醇 (第二军医大学政翔化学试剂研究室)。 (3) 蜗牛酶 (中国科学院生物物理研究所)。 (4) SE 溶液: 0.15mol/L NaCl + 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0。 (5) SDS: 20% 十二烷基磺酸钠溶液。 (6) 苯酚 (上海试剂一厂)。 (7) 1 SSC: 0.15mol/L NaCl + 0.015mol/L 柠檬酸三钠, pH 7.0。 (8) RNase (Merck)。

本文承蒙吴绍熙、郭宁如教授指导和帮助, 谨致谢意。

2. 仪器: (1) KE-84 旋转式恒温振荡水浴培养箱(上海老港医疗器械厂)。(2) 电热恒温水温箱(上海医疗器械七厂)。(3) 80-1型离心沉淀机(上海手术器械厂)。(4) TGL-16C 高速台式离心机(上海安亭科学器械厂)。(5) 7520 型分光光度计(上海分析仪器厂)。(6) G+C mol% 测定装置(浙江华阳科学仪器厂)。

(三) 操作过程

隐球菌
↓
巯基化合物预处理
↓
蜗牛酶, 37℃, 1 小时
↓
SE 液反复洗涤, 去除多糖
↓
加 SDS, 55℃, 10 分钟溶解原生质体
↓
加苯酚、氯仿脱蛋白、离心
↓
重复 2—3 次氯仿脱蛋白、离心
↓
加 1 倍体积 95% 乙醇, 离心, 收集 DNA 沉淀
↓
在 0.1SSC 中溶解后调整至 1SSC
↓
加 1 倍体积异丙醇, 离心收集 DNA 沉淀
↓
在 0.1SSC 中溶解后调整至 1SSC
↓
加 RNase, 37℃, 30 分钟
↓
重复 2—3 次氯仿脱蛋白、离心
↓
加 1 倍体积 95% 乙醇, 离心收集 DNA 沉淀
↓
在 0.1SSC 中溶解后调整至 1SSC, 备用

结果与讨论

所得各 DNA 样品在波长 260、230、280nm 的 OD 值比值均接近于 1.0:0.450:0.515, 与天然纯的 DNA 一致。用热变性法检测 T_m 值所得的隐球菌属 DNA G+C mol% 值变异范围为 47.82—61.98, 亦与文献值(49—65)^[4]接近。用 NIH 提供的标准菌株作对照, NIH₄₄₄ 的 DNA G+C mol% 值为 57.34, 与文献值(57.2±0.2)^[2]一致。

(一) 细胞壁消化方面

热处理是细胞壁碎裂的关键。每克湿菌加入 30mg 蜗牛酶, 作用 1 小时, 菌体几乎完全碎裂。若不进行热处理, 即使蜗牛酶作用 3 小时或/和酶用量加倍(60mg/g 湿菌), 绝大多数菌体的形态正常, 加入 SDS 和高氯酸钠后亦无明显变化, 没有碎壁的菌体仍混合在离心后的中层中。加热可使 DNA 从其他细胞大分子中释放出来^[3]。但是, 热处理对于真菌, 特别是促进隐球菌细胞壁碎裂的机制尚待进一步探讨。

(二) DNA 提纯方面

若不用 SE 液洗涤原生质体, 1 克湿菌最终得到的 DNA 呈淡黄色, 约黄豆粒大。含有夹膜多糖的 DNA 溶液 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值可以正常, 但 OD₂₃₀ 明显高于 OD₂₆₀, 甚至 3—4 倍于 OD₂₆₀。虽然异丙醇具有去除多糖类杂质和选择沉淀 DNA 的作用, 但若反复用异乙醇, DNA 丢失太多, 甚至收集不到 DNA。将含有大量夹膜多糖的金黄透亮的原生质体溶液用 SE 液反复洗涤, 直至溶液变清(约 6—8 次), 再配合异丙醇的应用, 使 OD₂₆₀ 与 OD₂₃₀ 的比值接近于 1.0:0.450, 取得了理想的效果。根据 1.0 OD₂₆₀ 双链核酸 = 50 μg/ml^[4], 每克湿菌可获得 600 μg 以上的 DNA。

(三) 试剂方面

蜗牛酶溶解酵母细胞壁, 不仅要经巯基化合物预处理, 而且还需要在 pH 5.8—7.2 等渗的山梨醇溶液中进行。因山梨醇溶液放置较长时间容易产生絮状物, 试验中将粉状的山梨醇直接加到缓冲液中, 也会取得同样的效果。

苯酚的氧化产物能引起 DNA 磷酸二酯键的断裂, 且残留的酚需与氯仿互溶后才能除去。在实验中发现, 有时外观、颜色基本正常的水饱和酚, 加到裂解的菌液中, 会立即显出粉红色, 说明已有氧化产物形成, 使工作半途而废。若不用苯酚, 单用氯仿, 只要多脱几遍蛋白质, 也可取得同样的效果。

(四) 离心机方面

收集脱蛋白后含有 DNA 的上清液和收集乙醇沉淀出的 DNA, 通过 5000r/min 离心 10min 和 6000r/min 离心 15min, 一般都需要

用高速离心机。但经试验证明,普通离心机 4000r/min 也可获得同样的效果,只是时间要加倍。在离心收集用乙醇沉淀的 DNA 时,若室温偏高(超过 6°C),可在离心前和离心过程中,将 DNA 放在冰浴中冷却片刻,低温可促进 DNA 沉淀。这样,在没有高速离心机的条

件下,也可以进行隐球菌 DNA 的提取工作。

(五) 曲线形态

根据 DNA 样品在不同温度下的相对吸光度,可绘制出各个 DNA 样品的热变性曲线(图 1)。从图 1 中可看出,正常 DNA 形成的热变性曲线(图 1A)是陡的,而且可以重复出现。断裂的 DNA 形成的热变性曲线(图 1B),其 T_m 值明显偏低。故操作过程中应尽量减少 DNA 链的断裂。

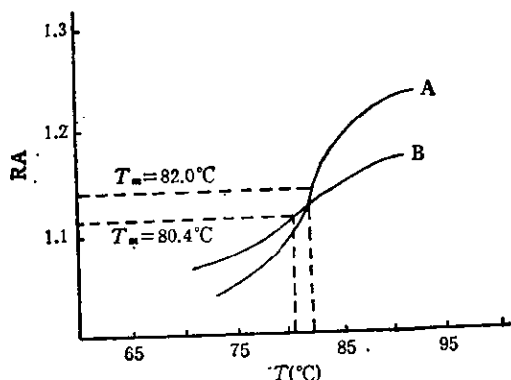


图 1 隐球菌 DNA 热变性曲线

A: 正常曲线 B: 断裂 DNA 形成的曲线

参 考 文 献

1. Storck R et al.: *J. Bacterial.* 95: 1069—72, 1969.
2. Aulakh HS et al.: *Int. J. Syst. Bacterial.* 31: 97—103, 1981.
3. 戴维斯等(陈德风等译): 高级细菌遗传学-遗传工程手册,第 98—189 页,天津科学技术出版社,天津,1984 年。
4. 程光胜等: 分析微生物学专辑,科学出版社,北京,第 88—98 页,1988 年。

(1991-11-18 收稿)

USING SNAIL ENZYMES TO EXTRACT AND PURIFY THE DNA OF *CRYPTOCOCCUS*

Zhao Zhiqiang

(401st Hospital of PLA, Qingdao 266071)

Liao Wanqing

(Changzhong Hospital, Shanghai 200003)

This article introduced a method to extract and purify the DNA of *Cryptococcus*. Protoplasts were obtained after digested by snail enzyme. We washed them with SE liquid again and again to get rid of the capsular polysaccharides and split them with thermal treatment of 55 degrees centigrade. Then, satisfactory results of the extraction and the purification were achieved. From one wet gram of the yeast, more than 600 μ g DNA can be acquired. The DNA gained is especially suited for the determination of G + C mol% content by use of the T_m method.

Key words *Cryptococcus*; DNA; Extraction; Snail enzyme